Enzymatyczne przemiany niektórych alkaloidów *Lupinus albus in vitro i in vivo*

Część I. Przemiany *in vitro**

Enzymatic transformations in vitro and in vivo of alkaloids of Lupinus albus

I. Transformations in vitro

E. NALBORCZYK

W szeregu prac wykonanych w naszej pracowni (Birecka, Sebyła, Nalborczyk 1959; Birecka, Rybicka, Szymańska 1960; Birecka, Sebyła 1960) stwierdzono, że wprowadzone drogą iniekcji do roślin łubinu białego populacji gorzkiej i pastewnej takie alkaloidy jak sparteina, lupanina oraz hydroksylupanina ulegają daleko idącym przemianom. Przemiany tych alkaloidów mogą prowadzić do powstania innych, charakterystycznych dla badanego gatunku zasad, względnie do powstania produktów o charakterze niealkaloidowym. Jednakże badania *in vivo* ograniczają możliwość wyizolowania ewentualnych pośrednich produktów tych przemian, a tym samym ich bliższą identyfikację. Jak już stwierdzono poprzednio (Nalborczyk 1961), wyciąg enzymatyczny z roślin populacji pastewnej *Lupinus albus* powoduje przemiany lupaniny do zasady zidentyfikowanej jako dehydrolupanina. Podobnie w wyciągach enzymatycznych z nasion *Lupinus angustifolius* (Piechowski, Nowacki 1959) sparteina ulega przemianom do swej dehydroformy. Fakty te skłoniły do bliższego przebadania przemian *in vitro* najczęściej występujących w gatunkach *Lupinus* alkaloidów.

Szczególną uwagę w niniejszych badaniach zwrócono na porównanie szeregu ekstraktów enzymatycznych z roślin populacji gorzkiej (odm. Czechnicka) i pastewnej (odm. Przebédowska Średniowczesna) *Lupinus albus* oraz na bliższe poznanie produktów przemian stosowanych alkaloidów, powstałych pod działaniem tych ekstraktów.

* Część niniejszych badań wykonano w ramach współpracy z Wydziałem Nauki Departamentu Rolnictwa USA.

METODYKA BADAŃ

A. Preparatyka frakcji enzymatycznych.

1. Ekstrakty ze świeżych roślin. 3—4-tygodniowe rośliny łubinu białego pastewnego oraz gorzkiego natychmiast po ścięciu zamrażano, mielono w temp. -60°C i ekstrahowano czterokrotną objętością 0,05 M buforu potasowo-fosforanowego o pH 7,2 w temp. 0°C . Osad po oddzieleniu supernatantu — przez wirowanie w temp. 1°C — powtórnie ekstrahowano buforem. Z połączonych supernatantów wytrącano białko, stosując równolegle każdy z opisanych niżej sposobów.

Wytrącanie etanolem: do zbuforowanego ekstraktu wkrapłano oziębiony do -12°C 50% etanol do końcowego stężenia 25%. Powstały osad odwirowano w temp. -7°C i rozpuszczono w małej ilości buforu. Roztwór przez ponowne wirowanie oczyszczono do zdenaturowanych białek. Wytrącanie kwasem octowym: ekstrakt buforowy zakwaszono 10% CH_3COOH do pH 4,4 i pozostawiono w temp. 0°C na 20 min. Osad odwirowano w temp. 0°C i rozpuszczono w 10 ml buforu.

Wytrącanie siarczanem amonu: do ekstraktu dodawano nasycony roztwór $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o temp. 0°C do uzyskania 33% nasycenia (196 g/l). Po 20 min. osad odwirowano przy 13 000 xg w temp. -4°C , dekantowano i po rozpuszczeniu w buforze dializowano przez 16 godz. 5 l 0,05 M KCl w temp. 1°C . Do supernatantu ponownie dodano siarczanu amonu do 66% nasycenia i po odwirowaniu osad dializowano jak wyżej.

2. Ekstrakty z proszku acetonowego. Rośliny zmielone w temperaturze -60°C zalewano 10-krotną objętością oziębionego do -18°C acetonu i ekstrahowano przez 5 min. Aceton odsączano i osad ponownie ekstrahowano. Ekstrakcję powtarzano jeszcze trzykrotnie, po czym osad osuszono strumieniem azotu i przechowywano pod próżnią w temp. około 0°C . Enzymatycznie czynną frakcję ekstrahowano buforem, białka wytrącano siarczanem amonu w granicy stężeń 33—66% nasycenia i dializowano jak wyżej.

B. Oznaczanie aktywności enzymatycznej przeprowadzono w standardowych warunkach: 0,5 ml ekstraktu + 1 ml 0,1 M buforu o pH 7,4 + $5\mu\text{M}$ alkaloidu. Inkubację prowadzono w obecności toluenu w temp. 37°C w ciągu 12 godz. Kontrolę stanowił substrat z dodatkiem przegotowanego w ciągu 5 min. ekstraktu. Alkaloidy po rozdziale chromatograficznym w układzie n-butanol:HCl:toluen (Reifer, Przedziecka, Kleczkowska 1959) eluowano i oznaczano ilościowo (Reifer, Niziołek 1957). Wstępną ocenę zawartości białek prowadzono metodą testową, opartą na stechiometrycznym wiązaniu czerni amidowej 10 B (Werner, Westphal 1955) przez zdenaturowane białka (po ich uprzednim naniesieniu na bibułę Whatman Nr 1). Oznaczenia ilościowe białek wykonano metodą kolorymetryczną (Lowsky, Ro-

senbrough, Farr, Randall 1951) posługując się krzywą wzorcową sporządzoną dla albuminy wołu. Wpływ temperatury i pH na aktywność ekstraktów z proszku acetonowego przebadano w stosunku do sparteiny, lupaniny i hydroksylupaniny. W optymalnych warunkach temperatury i pH badano wpływ stężenia tych alkaloidów. Badano również wpływ niektórych kationów, inhibitorów i kofaktorów, stosując stężenia od 10^{-5} do 10^{-2} M.

C. 1. Badanie wpływu soku z roślin na enzymatyczną aktywność ekstraktów z proszku acetonowego. Do 1 ml ekstraktu z roślin populacji pastewnej dodawano 2,5 mg sparteiny i od 0,1 do 0,5 ml świeżego lub przegotowanego soku z roślin populacji gorzkiej (uzyskanego po maceracji roślin). Natomiast sok z roślin populacji pastewnej dodawano, przy zachowaniu analogicznego sposobu postępowania, do ekstraktu z populacji gorzkiej. Całość dopełniano buforem do 3 ml i inkubowano jak wyżej.

2. Działanie nie oczyszczonych ekstraktów na sparteinę, lupaninę i hydroksylupaninę. Zamrożone rośliny populacji pastewnej i gorzkiej zmielono i ekstrahowano buforem fosforanowym. Po 16 godz. inkubacji z alkaloidem oznaczano ilości substratu i produktu jego przemian. W przypadku hydroksylupaniny stosowano po 625 μ g tego związku w postaci znakowanej ^{14}C * (radioaktywność całkowita 10^4 imp/min.). Po inkubacji roztwór odparowano, pozostałość rozpuszczono w 75% etanolu, nanoszono na chromatogram krążkowy i rozwijano w układzie n-butanol : HCl : toluen. Po wywołaniu odczynnikami Dragendorffa, chromatogramy pocięto na współśrodkowe krążki o szerokości 2 i 4 mm, które poddano ekstrakcji mieszaniną acetonu i etanolu (3 : 1). Oznaczano radioaktywność eluatów i ilość zawartych w nich alkaloidów.

3. Działanie ekstraktów z roślin innych gatunków na sparteinę. Nie oczyszczone ekstrakty buforowe z 5 g świeżej masy roślin *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Nicotiana glauca*, *Zea mays*, *Spinacia oleracea* i *Lupinus luteus* (populacja pastewna) porównywano pod względem ich aktywności w stosunku do sparteiny (przyjmując za 100% aktywność analogicznego ekstraktu z roślin łubinu białego pastewnego).

D. Rozdział frakcji białkowych ekstraktu enzymatycznego z łubinu białego pastewnego. 10 g proszku acetonowego ekstrahowano wyczerpująco buforem w temp. 0°C , białko wytrącano siarczanem amonu (końcowe stężenie 329 g/l) i odwirowano. Supernatant nagrzewano do temp. 40°C i następnie gwałtownie ochłodzono do 0°C . Osad odwirowano i po połączeniu z osadem pierwszym rozpuszczano w 5 ml buforu. Zdenaturowane białko usunięto przez wirowanie. Do ekstraktu dodano kroplami nasycony roztwór $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (końcowe stężenie 114 mg/ml) i następnie

* Sposoby uzyskania znakowanych alkaloidów podane zostaną w części II niniejszych badań.

równą objętość oziębionego do -12°C 96% etanolu, po czym osad odwirowano. Stężenie siarczanu amonu w supernatancie doprowadzono do 30% i w analogiczny sposób jak wyżej uzyskano dodatkowy osad. Połączone osady rozpuszczono w 3 ml buforu 0,05 M i dializowano 14 godz. 0,005 M buforem $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ o pH 6,8, a następnie 4 godz. 0,02 M buforem $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ o pH 6,8. Dializat w ilości 0,5 ml (13 mg białka) naniesiono na kolumnę z hydroksylapatytu, przez którą przepuszczano kolejno po 25 ml oziębionego do 2°C buforu ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6,8) o stężeniach od 0,02 M do 0,3 M stosując gradient stężeń 0,02 M (Tiselius, Hjerten, Levin 1956). Zbierano frakcje po 2 ml objętości, poddawano je analizie na zawartość białek i badaniu aktywności enzymatycznej w stosunku do lupaniny. Frakcje białek wykazujące aktywność enzymatyczną badano elektroforetycznie, stosując dwa bufora: a) fosforanowy 0,05 M, pH 7,4 (Lederer 1959) lub b) boranowy 0,05 M, pH 8,4 (Bier 1959).

E. Próby identyfikacji produktów przemian. W charakterze substratów stosowano alkaloidy*: sparteina, hydroksylupanina, angustifolina, multifloryna**, 17-oksosparteina, 17-oksolupanina oraz ester hydroksylupaniny.

Sparteina: Po inkubacji z ekstraktem enzymatycznym z proszku acetonowego*** z roślin populacji gorzkiej, produkt przemian oddzielano na kolumnie z celulozy stosując aceton: 1n HCl (8:2) i poddano analizie chromatograficznej, spektralnej w podczerwieni oraz redukcji wodorem nad PtO_2 w 2n HCl. Część produktu wykryształizowano w postaci pikrynianów i oznaczono temperaturę topnienia. 10 mg pikrynianu badanej zasady mieszano z 10 mg pikrynianu zasady uzyskanej ze sparteiny pod działaniem na ten alkaloid ekstraktu enzymatycznego z populacji pastewnej i badano obniżenie temp. topnienia. Do 1 mg znakowanego trytem (aktywność 8×10^4 imp/mg/min) produktu enzymatycznych przemian sparteiny (ekstrakt z populacji pastewnej) dodano 10 mg nieznakowanego produktu, otrzymanego pod działaniem ekstraktu z populacji gorzkiej. Po krystalizacji w postaci pikrynianów oznaczano aktywność właściwą wykryształizowanego alkaloidu i roztworu macierzystego.

Hydroksylupanina i angustifolina: Zastosowano podobny tok postępowania jak przy próbach identyfikacji produktów przemian sparteiny.

W badaniach nad pozostałymi alkaloidami ograniczono się do analizy chromatograficznej oraz absorpcyjnej w ultrafiolecie.

* Wyniki identyfikacji produktu enzymatycznych przemian lupaniny podane zostały we wcześniejszej publikacji (Nalborczyk 1961).

** Badano działanie na tę zasadę tylko ekstraktów z roślin populacji pastewnej.

*** We wszystkich następnych badaniach stosowano ekstrakty z proszku acetonowego.

WYNIKI

Wszystkie frakcje białkowe, niezależnie od sposobu ich otrzymania, wykazywały aktywność enzymatyczną w stosunku do użytych substratów: sparteiny, lupaniny i hydroksylupaniny. Każdy z tych alkaloidów ulegał *in vitro* przekształceniom tylko do jednej zasady reagującej z odczynnikami Dragendorffa. Zasadę tę względnie łatwo udawało się oddzielić chromatograficznie od alkaloidu — substratu. W tabeli 1 podana jest aktywność enzymatyczna frakcji białkowych otrzymanych z 10 g św. masy roślin populacji pastewnej. Jak wskazują uzyskane dane, przy zastosowanych sposobach wytrącania otrzymano różne ilości białek z jednakowej wyjściowej ilości materiału. Najwyższą aktywność całkowitą wykazują ekstrakty otrzymane na drodze frakcjonowanego wytrącania białek siarczanem amonu przy obu użytych stężeniach. Jednakże, biorąc pod uwagę aktywność właściwą należy stwierdzić, iż spośród zastosowanych sposobów najlepsze jest wytrącanie w stężeniach soli 33% do 66% nasycenia. Aktywność ta bowiem jest w tym przypadku 16-krotnie większa niż po wytrąceniu białka do 33% nasycenia.

Aktywność ekstraktów białkowych z roślin odm. gorzkiej okazała się w analogicznym stopniu zależna od sposobu wytrącania jak w przypadku

Tabela 1

Zawartość białka i aktywność enzymatyczna ekstraktów z roślin łubinu białego pastewnego
substrat: sparteina)

Protein content and enzymatic activity of extracts from plants of fodder white lupine
(substrate: sparteine)

Sposób otrzymywania frakcji białek Protein fractions obtained by	Białko (w mg) Protein (in mg)	Aktywność całkowita* Total activity*	Aktywność właściwa** Specific activity**
Wytrącanie etanolem Alcohol precipitation	80	14,1	0,176
Wytrącanie kwasem (do pH 4,4) Acidic precipitation (to pH 4,4)	66	9,2	0,139
Wytrącanie (NH ₄) ₂ SO ₄ (do 33%) (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (to 33 percent)	95	21,0	0,221
Wytrącanie (NH ₄) ₂ SO ₄ (od 33 do 66%) (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (from 33 to 66 percent)	8,2	29,4	3,585

* W 1 M substratu przekształconego w ciągu godziny. 1 M of substrate transformed per hour.

** W 1 M substratu przekształconego w ciągu godziny na 1 mg białka. 1 M of substrate transformed per hour by 1 mg of protein.

ekstraktów z roślin odm. pastewnej. Nie różniła się również od tych ostatnich i w wielkościach bezwzględnych.

Szczegółowszemu badaniu poddano proszek ocetonowy, a mianowicie sprawdzono jego aktywność w stosunku do sparteiny, lupaniny i hydroksylupaniny (tabela 2). Również i w tym przypadku wytrącanie 33—66% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dało najlepsze wyniki. Należy podkreślić, iż przy wszystkich zastosowanych ekstraktach, im bardziej utleniony był substrat, tym większa jego ilość ulegała przekształceniu w jednostce czasu. Taką samą tendencję stwierdzono w badaniach nad ekstraktami z populacji gorzkiej łubinu. Przyjmując aktywność enzymatyczną w stosunku do sparteiny za 100%, szybkość przemiany substratu wzrasta odpowiednio dla lupaniny średnio o około 30% i dla hydroksylupaniny o około 60%. Maksymalny średni błąd przy oznaczaniu tych wartości (każdej w pięciu powtórzeniach) nie przekraczał 7%.

Stosując białkową frakcję siarczanową (33—66%), uzyskaną z buforowych ekstraktów z proszku acetonowego obu populacji łubinu, badano wpływ niektórych czynników na jej aktywność enzymatyczną. Wpływ temperatury przedstawia ryc. 1. Krzywe aktywności przebiegają parabolicznie i pokrywają się wzajemnie. Optimum temperatury leży w granicach 30—45°C. Przy 57°C aktywność enzymatyczna obniża się do 1/4 aktywności wykazywanej w temperaturze optymalnej. W przypadku lupaniny i hydroksylupaniny optimum temperatury leży w zakresie 25—40°C.

Zależność aktywności enzymatycznej ekstraktów z formy pastewnej łubinu białego od wartości pH przedstawia ryc. 2. Optimum występuje w zakresie pH 6,6—7,8 i jest praktycznie jednakowe dla trzech bada-

Tabela 2

Aktywność enzymatyczna ekstraktów z proszku acetonowego (łubin biały pastewny)
Enzymatic activity of extracts from acetone powder (fodder white lupine)

Sposób otrzymywania frakcji białek Protein fractions obtained by	Aktywność enzymatyczna w μM substratu przekształconego przez 1 ml ekstraktu w ciągu godziny Enzymatic activity in μM substrate transformed by 1 ml extracts per hour		
	sparteina sparteine	lupanina lupanine	hydroksylupanina hydroxylupanine
Ekstrakcja buforem fosforanowym Extraction with phosphate buffer	1,422	1,873	2,235
Wytrącanie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0—33%) Precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0—33%)	1,117	1,615	1,948
Wytrącanie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (33—66%) Precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (33—66%)	2,132	2,801	3,580

nych jako substraty alkaloidów. Przy pH niższym, zaobserwowano istotne różnice w działaniu ekstraktu na poszczególne zasady. Np. przy pH 5,6 nie stwierdzono już przemian sparteiny, podczas gdy ilość przekształconej lupaniny i hydroksylupaniny stonowała w tych warunkach odpowiednio 20 i 40% ilości stwierdzonej przy pH optymalnym. Całkowity zanik przemian lupaniny wystąpił przy pH 5,2, natomiast hydroksylupanina ulegała jeszcze przekształceniu przy pH 4,8. Przebieg krzywych

Ryc. 1. Wpływ temperatury na aktywność enzymatyczną ekstraktów z populacji pastewnej i gorzkiej łubinu białego (substrat: sparteina). I — populacja pastewna; II — populacja gorzka

The influence of temperature on the enzymatic activity of extracts from plants of fodder and bitter varieties (substrate: sparteine). I — fodder variety; II — bitter variety

powyżej pH 8 wskazuje na stopniowy spadek aktywności enzymatycznej wraz ze wzrostem pH. Stopień zmniejszenia się aktywności wydaje się być również zależny od rodzaju substratu. Wskazują na to wyniki uzyskane przy pH 8,3, przy którym ilość przekształconego alkaloidu w porównaniu z warunkami optymalnego pH wynosi: sparteina — 90%, lupanina — 75% i hydroksylupanina — 50%. Zmiany aktywności ekstraktu z roślin populacji gorzkiej w zależności od pH były podobne do zmian wyżej opisanych.

Ryc. 2. Wpływ pH na aktywność enzymatyczną ekstraktów z populacji pastewnej łubinu białego. I — hydroksylupanina; II — lupanina; III — sparteina

The influence of pH on the enzymatic activity of extracts from plants of the fodder variety. I — hydroksylupanine; II — lupanine; III — sparteine

W optymalnych warunkach temperatury i pH przebadano wpływ stężenia sparteiny, lupaniny i hydroksylupaniny na enzymatyczną aktywność ekstraktów z roślin obu populacji. Wyniki uzyskane przy stosowaniu ekstraktu z populacji pastewnej przedstawia ryc. 3. Optymalne stężenie substratu w przypadku sparteiny wynosiło 2–4,5 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Zakres zaś optymalnych stężeń dla lupaniny i hydroksylupaniny był znacznie szerszy (lupanina 2–7,4 $\mu\text{M}/\text{ml}$; hydroksylupanina 3–8 $\mu\text{M}/\text{ml}$). Analogiczne wyniki uzyskano przy stosowaniu ekstraktu enzymatycznego z roślin populacji gorzkiej. We wszystkich omawianych niżej badaniach o charakterze ilościowym stosowano stężenie substratu około 3 μM określonego alkaloidu w 1 ml badanego roztworu.

W wyniku prób aktywacji i inhibicji enzymatycznego ekstraktu przez szereg związków stwierdzono następujące fakty, analogiczne dla obu badanych populacji. Kationy Na^+ i Ca^{++} w stężeniach od 10^{-5} do 10^{-2} M

Ryc. 3. Wpływ stężenia substratu na aktywność enzymatyczną ekstraktów z roślin populacji pastewnej. I — sparteina; II — lupanina; III — hydroksylupanina. The influence of substrate concentration on the enzymatic activity of extracts from plants of the fodder variety. I — sparteine; II — lupanine; III — hydroxylupanine

nie wykazywały wpływu na aktywność ekstraktu, podczas gdy Mg^{++} , Hg^{++} i Zn^{++} zwiększały ją średnio o około 20%. Kationy Co^{++} , Cu^{++} , Ba^{++} i Ag^+ w stężeniach 10^{-3} M wykazywały 40% inhibicję, a w stężeniu 10^{-2} M całkowite zahamowanie enzymatycznej aktywności. Wersen wprowadzony do roztworu przed dodaniem tych kationów nie powodował odwrócenia inhibicji (sam wersen w stężeniu 10^{-2} M wykazywał nieznaczną aktywację). Również dializa tylko w przypadku Cu^{++} spowodowała odwrócenie inhibicji. Całkowitą inhibicję uzyskano przy działaniu NaN_3 (10^{-3} M) i KCN (10^{-3} M). Kwas p-chlorortęciobenzoesowy i NaAsO_2 w stężeniach 10^{-3} M nie powodowały inhibicji. H_2O_2 w żadnym ze stosowanych stężeń nie wykazywała wpływu na aktywność ekstraktu.

W przypadku wprowadzenia ATP w stężeniach od $2 \cdot 10^{-4}$ do $3 \cdot 10^{-3}$ M obserwowano zwiększenie się aktywności ekstraktu o około 30%, podczas gdy stężenie 10^{-2} M powodowało już wyraźną inhibicję. Dodawanie

Tabela 3

Enzymatyczna aktywność nie oczyszczonych buforowych ekstraktów z roślin pastewnych i gorzkich łubinu białego (w μM substratu przekształconego przez 1 ml ekstraktu w ciągu godziny)

Enzymatic activity of unpurified extracts (with a buffer solution) of fodder and bitter white lupine (μM of transformed substrate by 1 mg extract per hour)

Ekstrakt z populacji roślin Extract from plants of	Przed dializą Before dialysis		Po dializie After dialysis	
	sparteina sparteine	lupanina lupanine	sparteina sparteine	lupanina lupanine
Pastewna Fodder var.	0,8	1,6	0,6	1,2
Gorzka Bitter var.	0,06	0,09	0,5	1,0

ADP nie okazało istotnego wpływu na aktywność ekstraktu. DPN w stężeniu $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ zwiększał aktywność enzymatyczną o około 25%. Samo wprowadzenie do przegotowanego ekstraktu enzymatycznego związków będących aktywatorami, względnie inhibitorami nie powodowało żadnych zmian substratu.

W trakcie badań nad aktywnością enzymatyczną nie oczyszczonych buforowych ekstraktów zaobserwowano, iż ekstrakty z łubinu gorzkiego wykazują znacznie niższą aktywność enzymatyczną niż podobne ekstrakty z analogicznej liczby i masy roślin populacji pastewnej (tabela 3). Dializa ekstraktu z łubinu gorzkiego prowadziła do zwiększenia jego aktywności do poziomu zbliżonego do aktywności ekstraktu z populacji pastewnej. W celu bliższego przebadania tego zjawiska, do frakcji białek wytrąconych siarczanem amonu w granicy stężeń 33—66% nasycenia, dodawano świeży sok z roślin populacji gorzkiej. Uzyskane wyniki przedstawione zostały w tabeli 4. Zmniejszenie aktywności enzymatycznej ekstraktów powodował nie tylko świeży, ale i przegotowany sok z roślin populacji gorzkiej (ten ostatni nawet w większej mierze). Stopień inhibicji zależał od ilości dodanego soku. Wprowadzenie do badanego ekstraktu mieszaniny rodzimych alkaloidów populacji gorzkiej w ilości, w której były one obecne w dodawanym soku, nie wywołało zmian jego aktywności. Wprowadzając w podanych w tabeli 4 ilościach sok z roślin populacji pastewnej do oczyszczonego ekstraktu z populacji gorzkiej nie stwierdzono inhibicji. Należy jednakże podkreślić, że stosowanie większych niż 0,5 ml ilości przegotowanego soku z roślin pastewnych wywołało inhibicję (w około 20%) jednakową dla frakcji siarczanowej z gorzkiej i pastewnej populacji.

Tabela 4

Działanie soku z roślin gorzkiej populacji na enzymatyczną aktywność ekstraktu z łubinu pastewnego (substrat: sparteina)

The influence of juice obtained from plants of bitter var. on the enzymatic activity of extracts from plant of fodder var. (substrate: sparteine)

Ilość dodanego soku z roślin (w ml) Volume of plant juice (ml)	Aktywność ekstraktu (w %)* po zastosowaniu Extract activity (%)* after application of	
	świeżego soku fresh juice	soku przegotowanego boiled juice
0,1	100	100
0,2	100	90
0,3	85	82
0,4	80	68
0,5	70	60

* Za 100% przyjęto aktywność samego ekstraktu z populacji pastewnej. The activity of pure extract from fodder var. is assumed as 100 per cent.

Badając przekształcenia sparteiny i lupaniny w nie oczyszczonych ekstraktach buforowych stwierdzono dodatkowo, że sumaryczna ilość substratu i produktu odpowiadały wyjściowej zawartości alkaloidu, podobnie jak w przypadku ekstraktów oczyszczonych. Natomiast przy stosowaniu jako substratu hydroksylupaniny, łączna ilość tej zasady i produktu jej przekształceń po 16 godz. inkubacji z nie oczyszczonym wyciągiem była o około 50% mniejsza od ilości wprowadzonej. (Zawartość hydroksylupaniny w kombinacji kontrolnej nie ulegała zmianie). Dla wyjaśnienia tego zjawiska zastosowano znakowaną ^{14}C hydroksylupaninę. Po zastosowaniu dalszego toku postępowania (patrz metodyka) uzyskano informacje odnośnie udziału aktywności alkaloidów w ogólnej radioaktywności związków po inkubacji (ryc. 4). Maksymalna zawartość alkaloidów i odpowiadającej im radioaktywności występują wokół R_f 0,23 (produkt enzymatycznych przemian hydroksylupaniny — patrz niżej) i 0,33 (hydroksylupanina). Około 50% radioaktywności znajduje się w miejscach, które nie wykazują obecności zasad reagujących z odczynnikiem Dragendorffa. W kontroli rozmieszczenie alkaloidu na chromatogramie pokrywa się z rozmieszczeniem radioaktywności (ryc. 5). Pod wpływem więc ekstraktów nie oczyszczonych alkaloid ten — w odróżnieniu od wszystkich innych badanych zasad — może ulegać dalej idącym przekształceniom.

Dla uzupełnienia ogólnej charakterystyki ekstraktów enzymatycznych z łubinu białego wydawało się celowe porównać ich aktywność z aktywnością podobnych ekstraktów z roślin innych gatunków. Doświadczenia

Ryc. 4. Rozmieszczenie alkaloidów i radioaktywności wzdłuż chromatogramu (akstrakt aktywny). 1 — radioaktywność, 2 — zawartość alkaloidów; S — start; F — front

The distribution of alkaloids and of radioactivity along the chromatograms (active aextract). 1 — radioactivity; 2 — alkaloids contents, S — start; F — front

Ryc. 5. Rozmieszczenie alkaloidów i radioaktywności wzdłuż chromatogramu (kontrola). 1 — radioaktywność; 2 — zawartość alkaloidów. S — start; F — front

The distribution of alkaloids and of radioactivity along the chromatograms (control-boiled extract). 1 — radioactivity; 2 — alkaloids contents. S — start; F — front

te prowadzono stosując sparteinę jako substrat. Przyjmując za 100% aktywność ekstraktu nie oczyszczonego z roślin łąbinu białego pastewnego, aktywności te kształtowały się następująco (w %): *Nicotiana glauca* — 0, *Zea mays* — 0, *Phaseolus vulgaris* — 15, *Vicia faba* — 20, *Spinacia oleracea* — 40, *Lupinus luteus* (populacja pastewna) — 60. W przypadku szpinaku po inkubacji ekstraktu ze sparteiną, wykryto obok typowego dla niej w ekstraktach łąbinowych produktu — nową zasadę reagującą z odczynnikiem Dragendorffa o R_f w układzie n-butanol : HCl : toluen podobnym do R_f angustifoliny.

W celu zwiększenia enzymatycznej aktywności właściwej ekstraktu z roślin pastewnych, przeprowadzono stopniowe oczyszczanie białek z proszku acetonowego oraz ich rozdział na kolumnie z hydroksylapatytu. W trakcie zastosowanego sposobu oczyszczania ekstraktu (do chwili jego rozdziału na kolumnie) sumaryczna zawartość białek zmniejszyła się o 63%, a całkowita aktywność enzymatyczna o 11%. Po rozdziale ilość białek zmniejszyła się o dalsze 70%. Przebieg rozdziału frakcji białkowych oraz ich aktywność enzymatyczną przedstawia ryc. 6. W wyniku eluacji białek buforem fosforanowym o wzrastającym stężeniu uzyskano rozdział ekstraktu na pięć głównych frakcji. Aktywność enzymatyczną

Ryc. 6. Rozdział frakcji białkowych na kolumnie z hydroksylapatytu. 1 — białko, 2 — aktywność właściwa enzymu. * w μM lupaniny przekształconej przez 1 mg białka w ciągu godziny

The separation of protein fractions on column of hydroxylapatite. 1 — protein. 2 — specific activity of enzyme. * in μM lupanine transformed by 1 mg proteins per hour

w stosunku do lupaniny* wykazywała w obecności DPN tylko frakcja wyeluowana buforem o stężeniu od 0,14 do 0,22 M z wyraźnym maksimum przy 0,16 M. Enzymatyczna aktywność właściwa tej frakcji odpowiadała 11,5 μ M lupaniny przekształconej przez 1 mg białka w ciągu godziny. Frakcja ta nie ulegała rozdzielowi elektroforetycznemu przy zastosowanych buforach boranowym i fosforanowym. Jej widmo absorpcji w ultrafiolecie (około 300 μ g białka w 1 ml) przedstawia rys. 7. Wykazuje ono w badanym zakresie obecność pięciu maksimum absorpcji

Ryc. 7. Widmo absorpcji w ultrafiolecie aktywnej enzymatycznie frakcji białkowej
The absorption spectrum in UV of the enzymatically active protein fraction

odpowiadających 280, 295, 366, 430 i 503 $m\mu$. Otrzymane widmo porównano z widmami absorpcji frakcji białkowych wymywanych z kolumny buforem o niższych (0,10—0,12 M) oraz wyższych (0,22—0,24 M) stężeniach. Istotne różnice w charakterze absorpcji (przy zachowaniu podobnych stężeń) wystąpiły w obszarze 330—480 $m\mu$ (ryc. 8). Białka mogące dawać „zazębienia” z badaną frakcją przy jej eluowaniu z kolumny nie posiadają przy 366 $m\mu$ wyraźnych maksimum absorpcji.

W dalszym ciągu niniejszych badań główną uwagę zwrócono na wyizolowanie oraz bliższą chemiczną i fizykochemiczną charakterystykę produktów przemian niektórych alkaloidów *Lupinus albus in vitro*.

Sparteina. Z 300 mg sparteiny otrzymano po inkubacji z ekstraktem enzymatycznym z roślin populacji gorzkiej około 100 mg produktu przemian — zasady reagującej z odczynnikiem Dragendorffa. Posiada ona

* Frakcja ta wykazała również aktywność enzymatyczną w stosunku do sparteiny i hydroksylupaniny.

charakter nienasycony i w obecności tlenu powietrza ulega szybkiemu rozkładowi, zamieniając się na brązową, nie destylującą żywicę. Chromatograficznie na wszystkich stosowanych fazach wykazuje R_f analogiczne do R_f Δ^5 -dehydrosparteiny. W wyniku katalitycznej redukcji wodorem nad PtO_2 w $2n$ HCl przechodzi ilościowo tylko w sparteinę (analogicznie ze sparteiną produkcji „Cefarm“ widmo absorpcji w obszarze $3750\text{—}750\text{ cm}^{-1}$). W podczerwieni badany związek jako wolna zasada (w chloroformie) wykazuje — analogicznie jak Δ^5 -dehydrosparteina — intensywną absorpcję przy 1640 cm^{-1} oraz jako nadchloran (w oleju parafinowym) przy 1645 cm^{-1} odpowiadającą absorpcji —C=C— (Leonard, Thomas, Gash 1952). Temperatura topnienia pikrynianu produktu enzymatycznego przekształcenia sparteiny wynosiła $204\text{—}206^\circ\text{C}$. Należy dodać, iż wszystkie podane wyżej własności badanej

Ryc. 8. Widma absorpcji frakcji białkowych. I — białko enzymatycznie aktywne (frakcja 0,16—0,18 M); II — białko eluowane buforem 0,10—0,12 M; III — białko eluowane buforem 0,22—0,23 M

The absorption spectrum of protein fractions. I — enzymatically active protein (fraction 0,16—0,18 M); II — protein eluated with buffer at 0,10—0,12 M; III — protein eluated with buffer at 0,22—0,23 M

zasady są identyczne z fizykochemicznymi własnościami dehydrosparteiny uzyskanej ze sparteiny pod działaniem na nią ekstraktu enzymatycznego z populacji pastewnej *Lupinus albus*. Nie stwierdzono depresji temperatury topnienia w przypadku mieszaniny pikrynianów tych dwóch związków. W wyniku zastosowania metody rozcieńczenia izotopowego uzyskano analogiczne aktywności obu zasad w postaci zarówno wykryszalowanej, jak i pozostałych w roztworze pikrynianów. Można więc uważać, że produkt przekształceń sparteiny pod wpływem ekstraktów enzymatycznych otrzymanych zarówno z gorzkiej, jak i pastewnej populacji jest dehydrosparteiną. Jednakże biorąc pod uwagę różnice w temperaturze topnienia pikrynianów, nie jest ona identyczna z Δ^5 -dehydrosparteiną (temp. topnienia dwupikrynianu tej ostatniej wynosi wg literatury (Rink, Groebel 1956) $189\text{—}190^\circ\text{C}$).

Hydroksylupanina. 100 mg hydroksylupaniny inkubowano z ekstraktem enzymatycznym z roślin populacji pastewnej. Po rozdziale alka-

loidów wyodrębniono w postaci chlorowodoru 25 mg produktu jej przemian o charakterze alkaloidu. Związek ten gwałtownie odbarwiał kwaśny roztwór KMnO_3 . Przeprowadzony w zasadę ulegał w chloroformie w obecności powietrza natychmiastowemu rozkładowi na związki nie reagujące z odczynnikiem Dragendorffa. W wyniku jego redukcji wodorem w 2n HCl otrzymano chromatograficznie 13-hydroksysparteinę, a w absolutnym etanolu — hydroksylupaninę. Badany produkt przemian hydroksylupaniny we wszystkich stosowanych układach posiadał R_f analogiczne do R_f multifloryny. Takie samo R_f wykazywała również dehydro-13-hydroksylupanina uzyskana syntetycznie z 13-hydroksylupaniny w reakcji z octanem rtęciowym (Bohlmann, Winterfeldt, Overwien, Pagel 1962). Wymienione trzy związki różniły się charakterem absorpcji w ultrafiolecie (ryc. 9). Multifloryna (I) wykazuje

Ryc. 9. Widma absorpcji w ultrafiolecie multifloryny (I), dehydro-13-hydroksylupaniny (II) i produktu enzymatycznych przemian 13-hydroksylupaniny (III)

The absorption spectra in UV of multiflorine (I), dehydro-13-hydroxylupanine and of enzymatic product of 13-hydroxylupanine transformations (III)

intensywną absorpcję przy 320 mμ związaną z obecnością pary sprzężonych wiązań podwójnych układu $\text{C}=\text{C}=\text{N}$, podczas gdy dehydro-13-hydroksylupanina (II) i badany związek (III) w podobnych stężeniach wykazują znacznie słabszą absorpcję i to w innym obszarze, a mianowicie 270 mμ (II) i 260 mμ (III). Obserwowane maksimum nasuwają przypuszczenie występowania w omawianych zasadach układu chromoforów $-\text{CO}-\text{NR}_2 + -\text{C}=\text{C}-\text{NR}_2$, podobnie jak to ma miejsce w przypadku Δ^5 -dehydro-17-oksosparteiny i afillydyny (Crow 1959).

Angustifolina. Z 5 mg zasady po inkubacji z ekstraktem enzymatycznym otrzymano około 2 mg produktu o R_f w układzie n-butanol : HCl : toluen zbliżonym do R_f lupaniny. Odbarwiał on gwałtownie kwaśny roz-

twór KMnO_4 . W wyniku katalitycznej redukcji wodorem w absolutnym etanolu przekształcił się ponownie w angustifolinę. Po redukcji w lodowatym kwasie octowym otrzymano — podobnie jak w przypadku redukcji angustifoliny — dihydroangustifolinę, a w $2n \text{ HCl}$ — dihydrodezoksyangustifolinę; zasady te identyfikowano chromatograficznie w trzech układach: 1) n-butanol nasycony wodą, 2) nasycony roztwór $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:etanol (Wiewiórowski, Bratek 1957) i 3) n-butanol:HCl:toluen Reifer, Przędziecka, Kleczkowska 1959). Wyniki te wskazują, że badany związek jest najprawdopodobniej dehydroangustifoliną.

W analogicznych warunkach jak w przypadku sparteiny, hydroksylupaniny i angustifoliny, inkubowano w obecności ekstraktów enzymatycznych z roślin pastewnych i gorzkich inne alkaloidy łubinowe: lupininę, 17-oksosparteinę, 17-oksolupaninę oraz ester hydroksylupaniny wyizolowany przez Sebyłę (Sebyła 1962) z roślin pastewnej populacji łubinu białego. W przypadku multifloryny zasadę tę inkubowano tylko w obecności ekstraktów z roślin populacji pastewnej. Chromatograficznie nie stwierdzono przemian żadnego z wymienionych alkaloidów w inne zasady reagujące z odczynnikiem Dragendorffa. Badania w ultrafiolecie nie wykazały zmian w charakterze absorpcji użytych alkaloidów po ich inkubacji z ekstraktem. Zmian w ich ilości również nie stwierdzono.

DYSKUSJA

Jak już wspomniano we wstępie, niniejsze badania, w których główną uwagę poświęcono enzymatycznym przekształceniom niektórych alkaloidów *in vitro*, miały na celu przede wszystkim: 1) poznanie początkowych etapów przemian tych związków, etapów które *in vivo* trudne są do uchwycenia i dokładniejszego przebadania oraz 2) porównanie wyciągów enzymatycznych z roślin gorzkiej i pastewnej populacji łubinu białego pod względem charakteru i intensywności przemian wprowadzonych jako substrat alkaloidów. Wyniki badań nad wyciągami enzymatycznymi z roślin populacji pastewnej i gorzkiej *Lupinus albus* wykazały obecność w obu populacjach enzymów, powodujących *in vitro* przemiany do innych zasad alkaloidów charakterystycznych dla badanego gatunku: sparteiny, lupaniny, hydroksylupaniny oraz angustifoliny. Uzyskane dane odnośnie szeregu właściwości enzymatycznych ekstraktów z roślin obu populacji pozwalają na stwierdzenie, iż posiadają one wiele wspólnych charakterystycznych cech. I tak, zastosowane różne sposoby wytrącania i oczyszczania białek wywołały analogiczne zmiany aktywności wyciągów niezależnie od populacji, z których je otrzymano. Optima temperatury, pH i stężenia przy wszystkich trzech badanych jako substraty alkaloidach były jednakowe dla obu rodzajów ekstraktów. Wszystkie związki powodujące aktywację ekstraktów z populacji pastewnej, po-

wodowały również aktywację analogicznych ekstraktów z roślin gorzkich. Takie samo zjawisko stwierdzono w przypadku stosowania substancji, które okazały się inhibitorami. Jest rzeczą prawdopodobną, iż obserwowane zjawiska aktywacji względnie też inhibicji nie charakteryzują bezpośrednio właściwości wyłącznie białka enzymatycznego, które w badanych ekstraktach stanowiło poniżej 5% ogólnej zawartości białek. Jednakże wprowadzone kationy metaliczne, niektóre inhibitory oraz ADP, ATP i DPN działając bezpośrednio na białka towarzyszące mogły okazać wpływ pośredni na białko enzymatycznie czynne. Jednakowe wyniki tego działania na ekstrakty z obu populacji wskazywałyby na ewentualnie zbliżony skład frakcji białkowych w badanych wyciągach. Wspólne dla obu odpowiednio oczyszczonych ekstraktów było również i to, iż zachodzące w wyniku ich działania przemiany różnych alkaloidów ograniczały

Ryc. 10

się do powstania tylko jednego produktu, który nie ulegał dalszym przekształceniom. Przeprowadzone badania w celu zidentyfikowania produktów enzymatycznych przekształceń sparteiny i lupaniny wykazały, że pierwszy z nich jest dehydrosparteina, drugi zaś dehydrolupanina. Wyniki prób identyfikacji produktu przekształceń hydroksylupaniny i angustifoliny *in vitro* wskazują na to, iż powstałe związki są najprawdopodobniej również dehydroformami tych alkaloidów. Istnieją więc podstawy do zaliczenia enzymów w badanych ekstraktach do grupy dehydrogenaz, przy czym dehydrogenaz o analogicznych dla obu populacji właściwościach.

Na podstawie wyników badania produktów redukcji otrzymanych enzymatycznie dehydrolupaniny i dehydrosparteiny można uważać, iż w obu przypadkach w reakcji enzymatycznego odwodorowania nie uczestniczy atom wodoru przy C₁₁, gdyż po redukcji tych zasad uzyskano sparteinę, w której pozostaje on w położeniu trans w stosunku do metylenowego mostka (ryc. 10). Po całkowitej natomiast redukcji $\Delta^{5,11}$ -dwudehydrosparteiny (Leonard, Thomas, Gash 1952) i Δ^{11} -dehydrolupaniny (Marion, Leonard 1951) powstaje α -izosparteina z wodorem przy C₁₁ w pozycji cis. Godny uwagi jest fakt, iż dehydrosparteina i dehydrolupanina otrzymane *in vitro* nie ulegały dalszym prze-

mianom nie tylko w oczyszczonych, ale również i w nie oczyszczonych ekstraktach. Należy również zaznaczyć, iż nie stwierdzono istotnych ubytków alkaloidów po inkubacji z maceratami. Powyższe uwagi pozwalają wysunąć przypuszczenie, że badane rośliny obu populacji (w każdym bądź razie młode) nie posiadają innych grup enzymów, które by *in vitro* w warunkach przeprowadzanych doświadczeń powodowały dalsze przekształcenia sparteiny i lupaniny, niż obserwowane przy stosowaniu oczyszczonych ekstraktów. W odróżnieniu jednak od dwóch wyżej omówionych zasad, hydroksylupanina w nie oczyszczonych ekstraktach enzymatycznych ulegała dalszym przekształceniom — najprawdopodobniej też o charakterze egzoergicznym — do produktów niealkaloidowych. Można przypuszczać, że w wyniku tych przekształceń nastąpiło rozerwanie pierścienia chinolizydynowego. Świadczyłoby to, iż spośród trzech badanych alkaloidów, hydroksylupanina wykazuje największy stopień przemiany. Obserwowane zjawisko nie wydaje się być „artefaktem“, gdyż w badaniach przeprowadzonych w naszej pracowni, zarówno opublikowanych (Birecka, Rybicka, Szymańska 1960) jak i jeszcze nie opublikowanych, nawet bezpośrednio po iniekcji hydroksylupaniny do roślin pastewnego czy gorzkiego łubinu białego stwierdza się znaczne zmniejszenie ilości tej zasady w porównaniu z ilością wprowadzoną. Zmniejszenie to nie znajduje usprawiedliwienia w zmianach zawartości innych wykrywalnych w roślinach alkaloidów. Takiego zjawiska nie obserwuje się natomiast bezpośrednio po wprowadzeniu do łubinu białego lupaniny czy też sparteiny. Na uwagę zasługuje fakt, iż przy zastosowaniu w charakterze substratu alkaloidów, obecności których nie stwierdzono w łubinie białym — lupininy, 17-oksosparteiny i 17-oksolupaniny, zarówno ekstrakty z populacji pastewnej, jak i gorzkiej nie powodowały ich przekształceń w inne związki. Również ester hydroksylupaniny (wyizolowany z roślin populacji pastewnej) nie wykazywał w tych warunkach jakichkolwiek przemian. Badania nad aktywnością enzymatyczną w stosunku do multifloryny prowadzone tylko przy zastosowaniu ekstraktów z populacji pastewnej (w której tego alkaloidu dotychczas nie udało się wykryć) dały wyniki negatywne. Na brak przekształceń wymienionych zasad mogło złożyć się szereg przyczyn: 1) brak powinowactwa enzymów badanych ekstraktów w stosunku do niektórych pochodnych chinolizydyny, 2) nieobecność w ekstraktach enzymów, katalizujących te przemiany. Odpowiedź na pytanie, czy tego typu enzymy występują w badanych roślinach wymaga dalszych doświadczeń. Na względnie szeroki zakres występowania w roślinach enzymów powodujących przekształcenia sparteiny mógłby wskazywać fakt przemian sparteiny pod działaniem enzymatycznych ekstraktów z innych niż łubiny gatunków roślin (w których nie stwierdzono dotychczas obecności tej zasady) do związku chromatograficznie identycznego z dehydrosparteiną.

Spośród innych gatunków łubinu, enzymatyczną aktywność w stosunku do sparteiny wykazywały ekstrakty z *Lupinus luteus* oraz badane przez Piechowskiego i Nowackiego (1959) ekstrakty z nasion *Lupinus angustifolius* (które według cytowanych autorów przekształciły tę zasadę również do dehydrosparteiny).

Oprócz wielu wspólnych charakterystycznych cech, ekstrakty enzymatyczne z obu populacji łubinu białego wykazywały również pewne różnice w swej aktywności, w zależności od użytego substratu. Różnice te przejawiały się: a) w różnej szybkości przemian w optymalnych warunkach temperatury, pH i stężenia alkaloidów o różnym stopniu utlenienia, b) w różnej wielkości zakresu optimum stężeń stosowanych zasad, jak i zakresu pH. Biorąc pod uwagę podkreślaną ostatnio w literaturze dużą specyficzność dehydrogenaz (V e n n e s l a n d 1961) należy przypuszczać, iż badane ekstrakty z roślin obu populacji łubinu białego mogą wykazywać obecność dotychczas nie opisaną w literaturze grupy dehydrogenaz chinolizydynowych. O dużym podobieństwie fizykochemicznym właściwości enzymów tej grupy mógłby świadczyć fakt, iż po rozdziale białek z roślin populacji pastewnej (na kolumnie z hydroksylapatytu) cała prawie aktywność enzymatyczna w stosunku do lupaniny koncentruje się w jednej frakcji nie dającej się rozdzielić elektroforetycznie (w zakresie zastosowanych warunków rozdzielu) i powodującej równocześnie intensywne przemiany sparteiny oraz hydroksylupaniny.

Na szczególne podkreślenie zasługuje zaobserwowany fakt, że nie oczyszczone wyciągi buforowe z roślin populacji gorzkiej wykazują znacznie niższą aktywność w porównaniu z takimi wyciągami z analogicznej ilości roślin populacji pastewnej. Ponieważ po dializie aktywność wyciągów z roślin gorzkich zwiększa się do poziomu aktywności ekstraktów z roślin pastewnych, nasunęło się przypuszczenie o ewentualnym występowaniu w roślinach populacji gorzkiej naturalnego niskocząsteczkowego (dializującego) inhibitora badanych enzymów. Potwierdzenie tego przypuszczenia znaleziono w wynikach badań z dodawaniem do ekstraktów z roślin pastewnych zarówno świeżego, jak i przegotowanego soku z roślin populacji gorzkiej. W obu przypadkach zaobserwowano inhibicję przemian sparteiny stosowanej jako substrat. Stopień inhibicji wzrastał wraz ze zwiększeniem ilości dodawanego soku z roślin gorzkich. Podobnego zjawiska nie stwierdzono dodając do wyciągów z roślin populacji gorzkiej soku roślin populacji pastewnej. Wyniki te wskazują na obecność w roślinach populacji gorzkiej związku (związków) powodującego częściową inhibicję przemian enzymatycznych rodzimych alkaloidów. Jednakże biorąc pod uwagę możliwość różnej lokalizacji w komórce roślinnej procesów przemian alkaloidów z jednej i występowania inhibitora z drugiej strony, jego ewentualna rola w tych przemianach wymaga odrębnych badań.

WNIOSKI

1. Ekstrakty enzymatyczne otrzymane zarówno z roślin populacji gorzkiej (odm. Czechnickiej), jak i pastewnej (odm. Przebédowskiej) łubinu białego powodują przemiany sparteiny, lupaniny, hydroksylupaniny i angustifoliny — alkaloidów charakterystycznych dla badanego gatunku.

2. W wyniku przemian sparteiny i lupaniny powstają odpowiednio dehydrosparteina i dehydrolupanina. Hydroksylupanina i angustifolina przekształcają się najprawdopodobniej również w swe dehydroformy. Badane ekstrakty wykazują więc obecność dehydrogenaz chinolizydynowych.

3. Optima temperatury, pH i stężenia, przy trzech badanych jako substraty alkaloidach — sparteinie, lupaninie i hydroksylupaninie — są jednakowe dla oczyszczonych enzymatycznych ekstraktów z obu populacji. Wszystkie przebadane związki powodujące aktywację (względnie inhibicję) ekstraktów z populacji pastewnej, powodują również aktywację (względnie inhibicję) ekstraktów otrzymanych w analogiczny sposób z roślin odmiany gorzkiej.

4. Ekstrakty z obu populacji wykazują analogiczne różnice w swej aktywności w zależności od użytego substratu. Polegają one na: a) różnej szybkości przemian — w optymalnych warunkach temperatury, pH i stężenia — alkaloidów o różnym stopniu utlenienia, b) różnej wielkości zakresu optimum stężeń stosowanych zasad, jak i zakresu pH.

5. W ekstraktach nie oczyszczonych jedynie hydroksylupanina ulega przekształceniom do związków niealkaloidowych (angustifolina nie była pod tym względem badana).

6. Alkaloidy, obecności których dotychczas nie stwierdzono w badanym gatunku: lupinina, 17-oksosparteina i 17-oksolupanina, nie ulegają przemianom w stosowanych ekstraktach enzymatycznych.

7. Spośród innych gatunków, enzymatyczną aktywność w stosunku do sparteiny wykazują ekstrakty z *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Spinacia oleracea* i *Lupinus luteus* (populacja pastewna).

8. Nie oczyszczone wyciągi z roślin populacji gorzkiej łubinu białego posiadają znacznie niższą aktywność niż analogiczne wyciągi z roślin pastewnych. Po dializie aktywność ta wzrasta do poziomu aktywności ekstraktów z roślin populacji pastewnej. Zarówno świeży, jak i przegotowany sok z roślin populacji gorzkiej powoduje inaktywację oczyszczonych ekstraktów z populacji pastewnej. Dodawanie do oczyszczonych ekstraktów z populacji gorzkiej soku roślin pastewnych nie okazuje istotnego wpływu na ich aktywność.

9. Aktywność enzymatyczną w stosunku do lupaniny — w oczyszczonych ekstraktach z populacji pastewnej — wykazuje głównie frakcja białek wyeluowana z kolumny hydroksylapatytowej buforem fosforano-

wym o stężeniu 0,16—0,18 M. Ilość tej frakcji stanowi poniżej 3% ogólnej zawartości białek w ekstrakcie. Jest ona również aktywna w stosunku do sparteiny i hydroksylupaniny.

Składam serdeczne podziękowanie prof. dr H. Bireckiej za cenne rady i wskazówki oraz za krytyczne uwagi udzielone mi w czasie wykonywania doświadczeń i opracowywania wyników. Dziękuję również dr J. Boettger — kierownikowi pracowni enzymologicznej Instytutu Biochemii Roślin Niemieckiej Akademii Nauk w Halle/Saale — za rady odnośnie wyboru metod ekstrakcji enzymów.

Katedra Fizjologii Roślin
SGGW w Warszawie

(Wpłynęło: 1.VII.1963)

SUMMARY

In the reported experiments enzymatic transformations in vitro of alkaloids occurring most frequently in *Lupinus* species were investigated. The most attention was paid to the activity to enzymatic extracts from bitter and fodder plant populations of *Lupinus albus* and to the character of compounds obtained as products of transformations of the investigated alkaloids. Among the facts noted the following are worth emphasizing:

1. Enzymatic extracts from plants (21—28 days old) of bitter and fodder varieties bring about transformations of sparteine, lupanine, hydroxylupanine and angustifoline — alkaloids characteristic for *Lupinus albus*.

2. The transformation products of sparteine and lupanine are dehydrosparteine and dehydrolupanine respectively. Hydroxylupanine and angustifoline is in all probability also transformed into their dehydroforms. Thus the investigated extracts contain some chinolizidine dehydrogenase.

3. The optima of temperature, pH and alkaloid concentration (sparteine, lupanine and hydroxylupanine as substrates) are similar for purified extracts from bitter as well as fodder plant populations. All investigated compounds which cause activation (or inhibition) of extracts from fodder population bring about activation (or inhibition) of extracts from bitter plants too.

4. The extracts from both populations show analogous differences in their activity depending on the substrate applied. They consist in: 1) a different rate of metabolising alkaloids of various oxidation degree — under optimal conditions of temperature, pH and concentrations; 2) a different magnitude of the range of pH and alkaloid concentration optima.

5. In unpurified extracts only hydroxylupanine undergoes transformations into nonalkaloid compounds (angustifoline was not investigated in this respect).

6. Lupanine, 17-oxosparteine and 17-oxolupanine i.e. alkaloids whose occurrence in *Lupinus albus* was not detected, do not undergo any changes in the investigated enzymatic extracts.

7. Extracts from plant of various species have been investigated. Only extracts from *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Spinacia oleracea* and *Lupinus luteus* (fodder variety) show enzymatic activity towards sparteine.

8. Unpurified extracts from plants of bitter white lupine exhibit a significantly lower activity than analogous extracts from fodder plants. After dialysis their activity increases to the level shown by extracts from the latter ones. The addition

of fresh as well as boiled sap from bitter plants brings about inactivations of purified extracts from fodder lupine plants. The additions of the sap from fodder plants to purified extracts from bitter ones has no influence on their activity.

9. In purified extracts from fodder plants the enzymatic activity towards lupanine is shown mainly by a protein fraction eluted from a hydroxylapatite column with a 0,16—0,18 M phosphate buffer solution. This fraction amounts to about 3% of the total protein content in extract. It shows an enzymatic activity also toward sparteine and hydroxylupanine.

LITERATURA

- Bier M., 1959, Electrophoresis, A.P., New York.
- Birecka H., Rybicka H., Szymańska W., 1960, Acta Soc. Bot. Pol., 29 (2).
- Birecka H., Sebyła T., Nalborczyk E., 1959, Acta Soc. Bot. Pol. 28 (2).
- Birecka H., Sebyła T., 1960, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. 8 (5).
- Bohlmann F., Winterfeldt E., Overwien H., Pagel K., 1962, Chem. Ber. 4 (944).
- Crow W. D., 1959, Austral. J. Chem. 12 (474).
- Lederer M., 1959, Chromatographic Reviews 1.
- Leonard M. J., Thomas P. D., Gash V. W., 1952, J. Amer. Chem. Soc. 77 (1955).
- Lowry D. H., Rosenbrough N. J., Farr A. J., Randall R. J., 1951, J. Biol. Chem. 193 (265).
- Marion L., Leonard N. J., 1951, Canad. J. Chem. 29 (355).
- Nalborczyk E., 1961, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. 9 (10).
- Piechowski M., Nowacki E., 1959, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. 7 (5).
- Reifer I., Niziołek S., 1957, Acta Bioch. Pol. 4 (3).
- Reifer I., Przeździecka N., Kleczkowska D., 1959, Acta Bioch. Pol. 6 (17).
- Rink M., Groebel H. J., 1956, Arch. Pharm. 289 (442).
- Sebyła T., 1962, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. 10 (297).
- Tiselius A., Hjerten S., Levin O., 1956, Arch. Bioch. Bioph. 65 (132).
- Vennesland B., 1961, V International Congress of Biochemistry 5 (38).
- Werner G., Westphal O., 1955, Angew. Chem. 67 (251).
- Wiewiórowski M., Bratek M. D., 1957, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. 20 (129).